

УДК 615.322: 547.972+543.544

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА КОРЫ ОРЕХА ЧЕРНОГО (*JUGLANS NIGRA* L.)*

© В.А. Куркин **, Н.И. Зименкина

Самарский государственный медицинский университет,
ул. Чапаевская, 89, Самара, 443099 (Россия), e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Орех черный (*Juglans nigra* L.) является перспективным видом лекарственного растительного сырья, препараты которого оказывают противомикробное, общеукрепляющее действие. На наш взгляд, вклад в антимикробную активность, наряду с нафтохинонами, вносят и флавоноиды, содержащиеся в сырье данного растения. В данной статье обсуждаются результаты исследования флавоноидного состава коры ореха черного (*Juglans nigra* L.). В результате проведенного сравнительного хроматографического исследования обнаружено наличие флавоноидов. С использованием колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 выделено доминирующее флавоноидное вещество – мирицитрин, имеющий в системах растворителей хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3) и *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2) величины R_f около 0,4 и 0,65 соответственно. Мирицитрин идентифицирован как 3-*O*- α -L-рамнопиранозид мирицетина на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов кислотного гидролиза.

Определено, что во всех УФ-спектрах извлечений из коры ореха черного наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы в присутствии 3% спиртового раствора AlCl_3 , что подтверждает наличие флавоноидов. В условиях дифференциальной спектрофотометрии наблюдается максимум поглощения в области 410–416 нм, что свидетельствует о целесообразности использования в методике анализа мирицитрина, имеющего максимум поглощения при длине волны 416 нм. В результате проведенного исследования разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного. Определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин во всех исследуемых образцах варьирует от $2.38 \pm 0.16\%$ до $3.02 \pm 0.11\%$.

Ключевые слова: орех черный, *Juglans nigra*, кора, флавоноиды, мирицитрин, спектрофотометрия, хроматографический анализ.

Введение

Орех черный (*Juglans nigra* L.) – растительный объект, являющийся представителем рода Орех (*Juglans* L.) семейства *Juglandaceae*. Известно, что род Орех насчитывает более 20 видов древесных растений, произрастающих в теплоумеренных районах Евразии и Северной Америки [1–7].

Интерес к ореху связан с наличием в наземной части ореха черного различных нафтохинонов, оказывающих антибактериальную активность, в частности, юглон, гидроюглон, глюкозид гидроюглона. Наряду с вышеуказанными биологически активными соединениями (БАС) растение содержит следующие ценные БАС – флавоноиды и другие фенольные соединения, липидные вещества, азотистые вещества, углеводы, органические кислоты, которые также вносят свой вклад в фармакологическое действие [8–17].

Одной из малоизученных групп соединений коры ореха черного являются флавоноиды. При этом необходимо учитывать тот факт, что в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов, существует необходимость определения действующих веществ гидрофильной природы, к которым относят флавоноиды данного растения [18–23].

Обзор литературы показал возможность стандартизации коры ореха черного при проведении количественного определения суммы нафтохинонов методом фотоколориметрии в пересчете

Куркин Владимир Александрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru, kurkinvladimir@yandex.ru

Зименкина Наталья Игоревна – аспирант, e-mail: n.i.zimenkina@samsmu.ru

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprtm.2022039223s

** Автор, с которым следует вести переписку.

на юглон [24, 25]. Извлечение получали методом двукратной экстракции спиртом этиловым 20% с последующим упариванием и трехкратной экстракцией диэтиловым эфиром [24, 25]. При этом определено, что содержание нафтохинонов в листьях ореха черного достигает $0.24\% \pm 0.01$ в пересчете на юглон [25, 25].

Имеется опыт количественного определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин [26]. При этом извлечение из коры ореха черного получали методом однократной экстракции спиртом этиловым 80%. Содержание флавоноидов в коре ореха черного достигает $5.13 \pm 0.02\%$ в пересчете на рутин [26].

В связи с противоречивостью литературных данных целью работы являлось изучение флавоноидного состава коры ореха черного в качестве перспективного источника биологически активных соединений.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выступала кора ореха черного (*Juglans nigra* L.). Образцы были собраны в период сокодвижения (апрель) в 2019 и 2020 годах в Ботаническом саду Самарского государственного университета. Кора была разрезана на полоски длиной до 15 см и шириной 2–3 см. Сушка коры проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей. Окончание сушки проверяли по ломкости коры. Для проведения анализа получали водно-спиртовые извлечения исследуемого сырья в соотношении 1 : 30 на 80%-ном этиловом спирте для качественной (тонкослойная хроматография) и количественной оценки (спектрофотометрия).

Выделение индивидуальных веществ из коры ореха черного проводили с использованием колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 в условиях градиентного элюирования смесью растворителей хлороформ-этанол в различных соотношениях. 60 г воздушно-сухого сырья коры ореха черного, заготовленной в Ботаническом саду Самарского университета, экстрагировали 70% этиловым спиртом, проводя вначале две экстракции при комнатной температуре в течение 24 ч, а затем при нагревании на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Объединенное водно-спиртовое извлечение упаривали под вакуумом до объема 50 мл, смешивали с 20 г силикагеля L 40/100 и высушивали. Высушенный порошок (сухой экстракт + силикагель) наносили на слой силикагеля (диаметр 8 см, высота 5 см), сформированный в виде взвеси в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ – этанол в различных соотношениях (99 : 1, 97 : 3, 95 : 5, 93 : 7, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20, 75 : 25, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60). Разделение веществ контролировали ТСХ-анализом. Фракции, содержащие мирицитрин, объединили, выпавший осадок отделили и перекристаллизовали из водного спирта. При этом получили мирицитрин с выходом 1.3% от массы воздушно-сухого сырья. Спектры ЯМР ^1H получали на приборе Bruker AM 300 (300 МГц), спектры ЯМР ^{13}C – на приборе «Bruker DRX 500» (126.76 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре Kratos MS-30.

Для количественного определения флавоноидов в коре ореха черного использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с раствором алюминия хлорида [8]. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием удельного показателя поглощения комплекса мирицитрина с 3% спиртовым раствором алюминия хлорида.

ТСХ осуществляли с использованием хроматографических пластинок «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», микропипеткой наносили 0.02 мл водно-спиртовых извлечений коры ореха черного, полученных на 40, 70 и 96% этиловом спирте, настойки коры ореха черного. Рядом микропипеткой наносили 0.01 мл растворы свидетелей – стандартный образец (СО) мирицитрина (мирицитин-3-О- α -L-рамнопиранозид). Определение проводили в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2) и хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3). Хроматографическую пластинку помещали в камеру, которую предварительно насыщали в течение 60 мин смесью растворителей и хроматографировали восходящим способом.

Полученную хроматограмму просматривали при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=254$ нм и $\lambda=365$ нм, а также обрабатывали 3% спиртовым раствором алюминия хлорида (AlCl_3) и щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК).

Содержание суммы флавоноидов в коре ореха черного (*Juglans nigra* L.) проводили методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 416 нм в пересчете на мирицитрин.

Обсуждение результатов

Флавоноид, выделенный из коры ореха черного, идентифицирован с использованием УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов кислотного гидролиза как мирицитин-3-О- α -L-рамнопиранозид (мирицитрин) (1), а его агликон – мирицитин, имеющий строение 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона (2) (рис. 1).

Мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона) (1). Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество с т.пл. 203–205 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ_{\max} , нм): 212, 260, 358; + NaOAc 268, 366; + NaOAc + H₃BO₃ 260, 382; +AlCl₃ 278, 416; +AlCl₃ + HCl 270, 406.

¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д., J/Гц): 12.68 (1H, с, 5-OH-группа), 9.23 (2H, уш. с, 7-OH-группа и 4'-OH-группа), 6.88 (2H, с, Н-2' и Н-6'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, Н-8), 6.19 (1H, д, 2.5 Гц, Н-6), 5.20 (1H, д, 1.5 Гц, Н-1'' рамнозы), 3.1–5.0 (м, 4Н рамнозы), 0.84 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы) (см. рис. 1 электронного приложения).

¹³C-ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO-d₆, δ_c , м.д.): С-4 (177.85), С-7 (164.24), С-5 (161.37), С-4' (157.57), С-9 (156.49), С-2 и С-3 (145.83), С-3' и), С-5' (145.83), С-1' (119.70, С-2' и С-6' (108.00), С-10 (104.12), С-1'' рамнозы (102.00), С-8 (98.41), С-6 (94.30), С-2' (116.21), С-3'' (71.03), С-5'' (70.62), С-4'' (70.47), С-2'' (70.08), С-6'' (CH₃) (17.57) (см. рис. 2 электронного приложения).

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °С, m/z): m/z 465.1016 [M+H]⁺, m/z 487.0830 [M+Na]⁺, m/z 503.0560 [M+K]⁺.

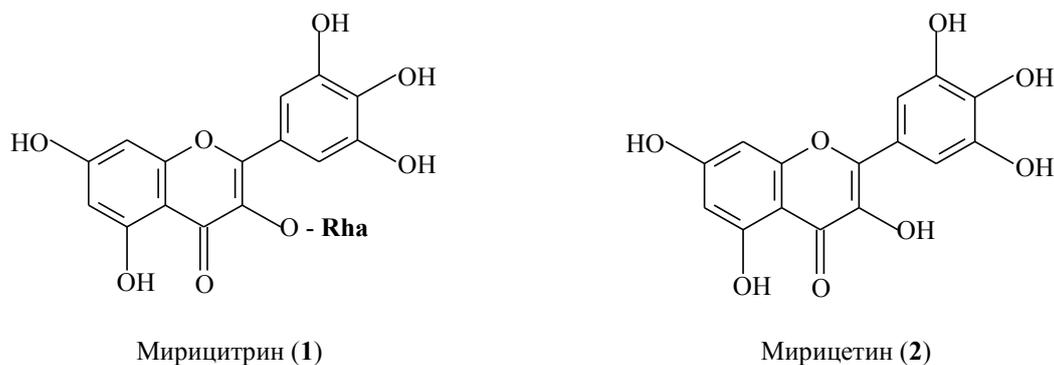


Рис. 1. Структурные формулы флавоноидов коры ореха черного

По результатам проводимых нами хроматографических исследований выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. Отмечается, что наиболее информативными являются хроматограммы, просматриваемые при длине волны 365 нм до и после обработки спиртовым раствором AlCl₃ и ДСК. В качестве стандарта использовался доминирующий флавоноид – мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид мирицитина), выделенный из коры ореха черного методом колоночной хроматографии.

Ранее методом ТСХ в присутствии растворов стандартных образцов не подтверждено наличие рутина, кверцетина в извлечениях из образцов коры ореха черного. Определено, что мирицитрин имеет в системах растворителей хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3) и *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2) величины R_f около 0.4 и 0.65 соответственно (см. рис. 3, 4 электронного приложения).

При сравнительном изучении электронных спектров водно-спиртовых извлечений из коры ореха черного обнаруживаются характерные для флавоноидов, в частности флавонолов, 2 максимума поглощения около 260 нм и 360 нм, что подтверждается батохромным сдвигом длинноволновой полосы в присутствии AlCl₃, а также данными дифференциальных спектров с максимумом поглощения 410–416 нм (см. рис. 5, 6 электронного приложения).

Нами было выявлено, что выделенный из коры ореха черного флавоноид во многом определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из коры ореха черного, а значит, является диагностически значимым веществом для данного вида сырья. Принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора выделенного флавоноида и водно-спиртового извлечения коры ореха черного находятся в области 416 нм (дифференциальный вариант), целесообразным является определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на выделенный флавоноид при длине волны 416 нм (см. рис. 7, 8 электронного приложения).

В ходе разработки методики нами определено, что оптимальными параметрами являются: 80% этиловый спирт, соотношение «сырье-экстрагент» – 1 : 30, время экстракции – 60 мин, аналитическая длина волны при 416 нм.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 80% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до ± 0.01 . Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1 : 30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Примечание. Приготовление раствора выделенного вещества. Около 0.0025 (точная навеска) миритрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл 80% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 80% этиловым спиртом до метки (раствор А миритрина). 5 мл раствора А миритрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б миритрина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 416 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 5 мл раствора А миритрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б миритрина).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на миритрин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$x = \frac{D \cdot m_0 \cdot 30 \cdot 50 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО миритрина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО миритрина, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия стандартного образца миритрина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 432 при длине волны 416 нм.

$$x = \frac{D \cdot 30 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 432 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 432 – удельный показатель поглощения ($E^{1\%}_{1\text{см}}$) миритрина при 416 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в коре ореха черного представлены в таблице 1. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4.92\%$ (табл. 1).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов коры ореха черного и выделенного вещества с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов миритрина (с концентрациями в диапазоне от 0.00795 до 0.02385 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0.99986.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора выделенного вещества с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98%. опыты с добавками СО мирицитрина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (опыты с добавками) (табл. 2).

Содержание суммы флавоноидов в коре ореха черного, определенное методом дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 416 нм представлено в таблице 3.

Содержание суммы флавоноидов для исследуемых образцов варьирует от $2.38 \pm 0.16\%$ до $3.02 \pm 0.11\%$ (в пересчете на мирицитрин).

Таблица 1. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного

n	f	\bar{X}	S	S _x	P(%)	T(P, t)	$\pm X$	E, %
11	10	2.84	0.06379	0.01923	95	2.23	± 0.14	± 4.92

Таблица 2. Содержание суммы флавоноидов в коре ореха черного в зависимости от добавления мирицитрина

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
25.0	6.0 (в сырье)	31.0	30.2	-0.8	-2.58
25.0	13.0 (в сырье)	38.0	39.1	+1.1	+2.83
25.0	19.0 (в сырье)	44.0	43.4	+0.6	-1.36

Таблица 3. Содержание суммы флавоноидов в образцах коры ореха черного (*Juglans nigra* L.)

№ п/п	Образец сырья	Оптическая плотность, D	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин и абсолютно сухое сырье, %
1	Ботанический сад Самарского университета (апрель 2018 г.)	0.8435	2.90 ± 0.11
2	Ботанический сад Самарского университета (апрель 2019 г.)	0.8192	2.84 ± 0.14
3	Ботанический сад Самарского университета (апрель 2020 г.)	0.7220	2.50 ± 0.16

Выводы

1. Проведенное сравнительное хроматографическое исследование позволило выявить наличие флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях из коры ореха черного.

2. С использованием колоночной хроматографии из коры ореха черного впервые выделен доминирующий флавоноид – мирицитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид), идентифицированный на основании данных УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов кислотного гидролиза.

3. Во всех электронных спектрах исследуемых образцов при добавлении спиртового раствора AlCl₃ обнаруживается батохромный сдвиг длинноволновой полосы, что свидетельствует о вкладе мирицитрина и других флавоноидов в кривую поглощения УФ-спектров. В условиях дифференциальной спектрофотометрии наблюдается максимум поглощения в области 410–416 нм. Это дает основание применять методику определения содержания суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 416 нм в пересчете на мирицитрин для коры ореха черного.

4. На основании сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений коры ореха черного разработана методика количественного определения суммы флавоноидов, заключающаяся в использовании 80% спирта этилового, экстракции в течение 60 мин в соотношении «сырье-экстрагент» – 1 : 30 при аналитической длине волны 416 нм.

5. Определено, что содержание суммы флавоноидов для исследуемых образцов варьирует от $2.38 \pm 0.16\%$ до $3.02 \pm 0.11\%$.

6. Таким образом, кора ореха черного является перспективным источником лекарственного растительного сырья и может служить источником биологически активных соединений – флавоноидов.

Список литературы

1. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР. М., 1976. С. 81–85.
2. Гуков Г.В., Личман А.Ю. Комплексное использование ореха маньчжурского на юге Дальнего Востока // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения): материалы II Международной конференции. Хабаровск, 2004. С. 233–236.
3. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий – перспективное лекарственное растение (обзор литературы) // Традиционная медицина: Российский фитотерапевтический съезд: сборник научных трудов съезда. 2010. №3 (22). С. 118–123.
4. Ильинская И.А. К систематике и филогении семейства *Juglandaceae* // Ботанический журнал. 1990. Т. 75. №6. С. 792–803.
5. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармац. вузов. Самара, 2019. 1278 с.
6. Lin Y., Liang J., Peng X., Ruan H. Phenolic constituents from the fresh pericarps of *Juglans sigillata* // Natural Product Research. 2019. Vol. 10. P. 1080. DOI: 10.1080/14786419.2019.1644631.
7. Paudel P., Satyal P., Dosoky N.S., Maharjan S., Setzer W.N. *Juglans regia* and *J. nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities // Nat. Prod. Commun. 2013. Vol. 8(10). Pp. 1481–1486.
8. Беленковская Л.М., Буданцев А.Л. Нафтохиноны видов флоры России и их биологическая активность // Растительные ресурсы. 2006. Т. 42(4). С. 108–141.
9. Дудников М.Э., Андреева И.Н., Арчинова Т.Ю. Сравнительные исследования суммарных фитопрепаратов, полученных из околоплодника некоторых разновидностей орехов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2003. Вып. 58. С. 203–204.
10. Ильичева Е.С. Основные способы получения 5-окси-1,4-нафтохинона (юглона) – антибактериального препарата широкого спектра действия // Вестник Казанского технологического университета. 2015. Т. 18(3). С. 147–150.
11. Картелев В.Г., Мишнев В.Г. Диагностика разновидностей ореха грецкого // Лесное хозяйство. 1976. №12. С. 39–40.
12. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. Самара, 2012. 290 с.
13. Орловская Т.В., Степанова Э.Ф., Гагуева А.У. Фитохимическое изучение околоплодника ореха грецкого // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. Пятигорск, 2003. Вып. 58. С. 73–74.
14. Тушканова О.В., Бойко И.Е. Исследование антибиотической активности юглона, выделенного из околоплодника *Juglans nigra* L. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. №1(18). С. 126–129.
15. Cruz-Vega D.E., Verde-Star M.J., Salinas-González N., Rosales-Hernández B., Estrada-García I., Mendez-Aragón P., Carranza-Rosales P., González-Garza M.T., Castro-Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens* // Phytother. Res. 2008. Vol. 22(4). Pp. 557–559. DOI: 10.1002/ptr.2343.
16. Ebrahimia I., Gashti M.P. Extraction of juglone from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for dyeing, anti-fungal finishing, and solar UV protection of wool // Coloration Technology. 2015. Vol. 131. Pp. 451–457. DOI: 10.1111/cote.12180.
17. Hasan T.N., B L.G., Shafi G., Al-Hazzani A.A., Alshatwi A.A. Anti-proliferative effects of organic extracts from root bark of *Juglans regia* L. (RBJR) on MDA-MB-231 human breast cancer cells: role of Bcl-2/Bax, caspases and Trp53 // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2011. Vol. 12(2). Pp. 525–530.
18. Железникова А.С. Изучение флавоноидов в листьях некоторых видов рода *Juglans*, интродуцированных в условиях Самарской области // Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием Аспирантские чтения – 2013: «Молодые ученые в медицине». 2013. С. 274–277.
19. Зайцева Е.Н., Дубищев А.В., Куркин В.А. Анализ влияния рутина и гравитационного воздействия на выделительную функцию почек // Наука и инновации в медицине. 2016. Т. 1. №4. С. 47–50.
20. Помогайбин А.В. Некоторые особенности химического состава и биологической активности листового опада видов рода Орех (*Juglans* L.) при интродукции в среднем Поволжье // Химия растительного сырья. 2002. №4. С. 43–47.
21. Cosmulescu S., Trandafir I., Nour V. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves // Pharm. Biol. 2014. Vol. 52(5). Pp. 575–580. DOI: 10.3109/13880209.2013.853813.
22. Kale Hu A.A. Spectrophotometric validation and standardization of a bioactive component from *J. regia* stem bark // SIJPCBS. 2012. Vol. 3(1). Pp. 133–136.
23. Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P.B., Ferreira I.C., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars // Food Chem. Toxicol. 2007. Vol. 45 (11). Pp. 2287–2295. DOI: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
24. Дайронас Ж.В., Кулешова С.А., Пшукова И.В. Фитохимическое изучение листьев грецкого ореха как источника антиоксидантного средства // Химия растительного сырья. 2010. №4. С. 95–98.
25. Дайронас Ж.В. Определение нафтохинонов в сырье и фитопрепарате ореха черного – *Juglans nigra* L. // Фармация. 2013. №4. С. 12–14.

26. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации коры ореха черного. Разработка подходов к стандартизации коры ореха черного // Аспирантский вестник Поволжья. 2020. №1–2. С. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.1.131-136.

Поступила в редакцию 18 февраля 2021 г.

После переработки 27 февраля 2021 г.

Принята к публикации 29 августа 2022 г.

Для цитирования: Куркин В.А., Зименкина Н.И. Исследование флавоноидного состава коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) // Химия растительного сырья. 2022. №3. С. 195–202. DOI: 10.14258/jcrpm.2022039223.

*Kurkin V.A.**, *Zimenkina N.I.* STUDY OF THE FLAVONOID COMPOSITION OF *JUGLANS NIGRA* L. BARK

Samara State Medical University, ul. Chapaevskaya, 89, Samara, 443099 (Russia), e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Juglans nigra L. is a species of trees of the *Juglandaceae* family. This representative of the genus Walnut (*Juglans* L.) has not been sufficiently studied in comparison with other species, including *Juglans regia* L., but *J. nigra* is promising type of medicinal plant material, which the preparations have an antimicrobial, restorative effect. In our opinion, the contribution to the main antimicrobial effect, along with naphthoquinones, is also made by the flavonoids, contained in the raw material of this plant. There are insufficient data in the literature to substantiate the chemical composition of the black walnut bark. There is a possibility of standardizing the leaves of black walnut when quantitative determination of the amount of naphthoquinones by photocolometry method in terms of juglone is carried out. This article discusses the results of a study of the flavonoid composition of the bark of black walnut (*Juglans nigra* L.) as a promising source of biologically active compounds. As a result of the comparative chromatographic study, the presence of flavonoids was detected using detection at a wavelength of 365 nm, after treatment with 3% ethanolic solution of aluminum chloride ($AlCl_3$) and diazobenzenesulfonic acid. In all water-alcohol extracts from the bark of the black walnut, the presence of rutin was not confirmed. Using column chromatography on silica gel L 40/100, the dominant flavonoid compound, myricitrin (3-O- α -L-rhamnopyranoside of myricetin), which has chloroform-ethanol-water (26 : 16 : 3) and *n*-butanol-acetic acid (glacial) in the solvent systems: water of R_f value about 0.4 and 0.65, respectively. Myricitrin was identified as 3-O- α -L-rhamnopyranoside of myricetin based on UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR spectroscopy, mass spectrometry, and acid hydrolysis results. It was determined that in all UV spectra of extracts from the bark of black walnut, a bathochromic shift of the long-wavelength band is observed in the presence of a 3% ethanolic solution of $AlCl_3$, which confirms the presence of flavonoids. Under the conditions of differential spectrophotometry, an absorption maximum is observed in the 410-416 nm area, which indicates the advisability of using myricitrin in the analysis procedure, which has an absorption maximum at a wavelength of 416 nm. As a result of the study, a method was developed for the quantitative determination of the total flavonoids in the bark of black walnut. The optimal parameters have been determined: extractant is 80% water-ethanolic solutions; the ratio "raw material-extractant" – 1 : 30; time of extraction - extraction on a boiling water bath for 60 min, the degree of grinding of the raw material – 2 mm, analytical wavelength at 416 nm. It was determined that the content of the total flavonoids calculated on myricitrin in all studied samples is varied from 2.38% to 3.02%.

Keywords: black walnut, *Juglans nigra*, bark, flavonoids, myricitrin, spectrophotometry, chromatographic analysis.

* Corresponding author.

References

1. Gubanov I.A., Krylova I.L., Tikhonova V.L. *Dikorastushchiye poleznyye rasteniya SSSR*. [Wild useful plants of the USSR]. Moscow, 1976, pp. 81–85. (in Russ.).
2. Gukov G.V., Lichman A.Yu. *Lesnyye biologicheski aktivnyye resursy (berezovyy sok, zhivitsa, efirnyye masla, pishchevyye, tekhnicheskiye i le-karstvennyye rasteniya): materialy II Mezhdunarodnoy konferentsii*. [Forest biologically active resources (birch sap, resin, essential oils, food, technical and medicinal plants): materials of the II International Conference]. Khabarovsk, 2004, pp. 233–236. (in Russ.).
3. Dayronas Zh.V., Zilfikarov I.N. *Traditsionnaya meditsina: Rossiyskiy fitoterapevticheskiy s"yezd: sbornik nauchnykh trudov s"yezda*. [Traditional medicine: Russian phytotherapeutic congress: collection of scientific papers of the congress], 2010, no. 3 (22), pp. 118–123. (in Russ.).
4. Il'inskaya I.A. *Botanicheskiy zhurnal*, 1990, vol. 75, no. 6, pp. 792–803. (in Russ.).
5. Kurkin V.A. *Farmakognosiya: uchebnik dlya studentov farmats. vuzov*. [Pharmacognosy: a textbook for students of pharmacology universities]. Samara, 2019, 1278 p. (in Russ.).
6. Lin Y., Liang J., Peng X., Ruan H. *Natural Product Research*, 2019, vol. 10, p. 1080. DOI: 10.1080/14786419.2019.1644631.
7. Paudel P., Satyal P., Dosoky N.S., Maharjan S., Setzer W.N. *Nat. Prod. Commun.*, 2013, vol. 8(10), pp. 1481–1486.
8. Belenovskaya L.M., Budantsev A.L. *Rastitel'nyye resursy*, 2006, vol. 42(4), pp. 108–141. (in Russ.).
9. Dudnikov M.E., Andreyeva I.N., Archinova T.Yu. *Razrabotka, issledovaniye i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii: sbornik nauchnykh trudov*. [Development, research and marketing of new pharmaceutical products: a collection of scientific papers]. Pyatigorsk, 2003, vol. 58, pp. 203–204. (in Russ.).
10. Il'icheva Ye.S. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2015, vol. 18(3), pp. 147–150. (in Russ.).
11. Kartelev V.G., Mishnev V.G. *Lesnoye khozyaystvo*, 1976, no. 12, pp. 39–40. (in Russ.).
12. Kurkina A.V. *Flavonoidy farmakopeynykh rasteniy: monografiya*. [Flavonoids of pharmacopoeial plants: monograph]. Samara, 2012, 290 p. (in Russ.).
13. Orlovskaya T.V., Stepanova E.F., Gaguyeva A.U. *Razrabotka, issledovaniye i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii: sbornik nauchnykh trudov*. [Development, research and marketing of new pharmaceutical products: a collection of scientific papers]. Pyatigorsk, 2003, vol. 58, pp. 73–74. (in Russ.).
14. Tushkanova O.V., Boyko I.Ye. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2017, no. 1(18), pp. 126–129. (in Russ.).
15. Cruz-Vega D.E., Verde-Star M.J., Salinas-González N., Rosales-Hernández B., Estrada-García I., Mendez-Aragón P., Carranza-Rosales P., González-Garza M.T., Castro-Garza J. *Phytother. Res.*, 2008, vol. 22(4), pp. 557–559. DOI: 10.1002/ptr.2343.
16. Ebrahimia I., Gashti M.P. *Coloration Technology*, 2015, vol. 131, pp. 451–457. DOI: 10.1111/cote.12180.
17. Hasan T.N., B L.G., Shafi G., Al-Hazzani A.A., Alshatwi A.A. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2011, vol. 12(2), pp. 525–530.
18. Zheleznikova A.S. *Materialy dokladov Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem Aspirantskiye chteniya – 2013: "Molodyye uchonyye v meditsine"*. [Proceedings of the All-Russian Conference with international participation Postgraduate readings – 2013: "Young scientists in medicine"], 2013, pp. 274–277. (in Russ.).
19. Zaytseva Ye.N., Dubishchev A.V., Kurkin V.A. *Nauka i innovatsii v meditsine*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. 47–50. (in Russ.).
20. Pomogaybin A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2002, no. 4, pp. 43–47. (in Russ.).
21. Cosmulescu S., Trandafir I., Nour V. *Pharm. Biol.*, 2014, vol. 52(5), pp. 575–580. DOI: 10.3109/13880209.2013.853813.
22. Kale Hu A.A. *SIJPCBS*, 2012, vol. 3(1), pp. 133–136.
23. Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P.B., Ferreira I.C., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. *Food Chem. Toxicol.*, 2007, vol. 45 (11), pp. 2287–2295. DOI: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
24. Dayronas Zh.V., Kuleshova S.A., Pshukova I.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2010, no. 4, pp. 95–98. (in Russ.).
25. Dayronas Zh.V. *Farmatsiya*, 2013, no. 4, pp. 12–14. (in Russ.).
26. Zimenkina N.I., Kurkin V.A. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*, 2020, no. 1–2, pp. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.1.131-136. (in Russ.).

Received February 18, 2021

Revised February 27, 2021

Accepted 29 August 2022

For citing: Kurkin V.A., Zimenkina N.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 3, pp. 195–202. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2022039223.